黄曲霉毒素分解酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达与应用*

史敦胜　聂利波　宋洋洋　李元晓　李　旺*

（河南科技大学动物科技学院，洛阳 471023）

摘　要：本试验旨在研究黄曲霉毒素分解酶（*ADTZ*）基因在枯草芽孢杆菌中的表达与应用。试验通过构建枯草芽孢杆菌 *ADTZ* 基因的整合表达载体，将 *ADTZ* 基因整合到野生型枯草芽孢杆菌（*B.subtilis* LN）中，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）初步检测 ADTZ 蛋白的表达情况。通过发酵试验，将重组枯草芽孢杆菌作为发酵菌种接种到发霉玉米中进行发酵试验，检测发霉玉米样品中黄曲霉毒素 B_1(AFB_1)含量的变化，验证 *ADTZ* 基因在枯草芽孢杆菌中的表达效果。结果表明，通过构建整合表达载体成功将 *ADTZ* 基因整合到枯草芽孢杆菌基因组中，在 SDS-PAGE 上检测到重组枯草芽孢杆菌能够分泌表达特异性蛋白条带。经过重组菌发酵的发霉玉米 AFB_1 的含量较未接种和接种野生型枯草芽孢杆菌发酵的发霉玉米 AFB_1 的含量差异显著（$P<0.05$）。由此可见，*ADTZ* 基因可成功整合到野生型枯草芽孢杆菌中，并进行了胞外分泌表达，表达产物具有生物活性，能有效地降解 AFB_1。

关键词：黄曲霉毒素分解酶；基因重组；枯草芽孢杆菌；发酵

中图分类号：S816　　文献标志码：A　　文章编号：

黄曲霉毒素（aflatoxin，AF）是一类化学结构类似的化合物，主要由黄曲霉（*Aspergillus flavus*）、寄生曲霉（*Aspergillus parasiticus*）等真菌生物合成的次级代谢产物组成[1-4]，属剧毒物质，具有强烈的致畸、致癌、致突变作用[5-6]。黄曲霉毒素分解酶（aflatoxin detoxification enzyme，ADTZ）是特异性分解黄曲霉毒素的活性物质，近年来微生物酶降解黄曲霉毒素的方法被广泛关注，但天然 ADTZ 由于含量低、活性差，很难从自然界中大量分离[7]。利用分子生物学和基因工程技术将 *ADTZ* 基因克隆并在不同宿主中进行表达，可以提高 ADTZ 的产量和活性，对减轻黄曲霉毒素污染状况有巨大的开发应用价值。*ADTZ* 基因来源于真菌假密环菌（*Armillariellatabescens*），表达产物为假密环菌的胞内酶[8]，具有降解天然黄曲霉毒素的能力，为一个完整的基因序列，在大肠杆菌和酵母菌中均能表达出活性特异蛋白[9-11]，

收稿日期：2017-11-08

基金项目：国家自然科学基金(31101744)；河南省重大科技专项（131100110300）

作者简介：史敦胜(1989—)，男，河南信阳人，硕士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail：1009662003@qq.com

*通信作者，李　旺，副教授，硕士生导师，E-mail：　liwang@haust.edu.cn

但在动物益生菌枯草芽孢杆菌中的表达并无报道[12]。枯草芽孢杆菌表达系统是原核生物中重要的表达系统，具备完整的分泌表达机制，被广泛应用于工业发酵领域，是多种酶制剂的主要生产菌种和表达宿主[13]。本研究通过前期构建的枯草芽孢杆菌整合表达载体和克隆的*ADTZ*基因，构建*ADTZ*基因枯草芽孢杆菌整合表达载体，并转化到枯草芽孢杆菌基因组中进行整合表达，并通过发酵试验验证其对黄曲霉毒素的降解能力，旨在为后续的霉菌毒素降解酶的开发和饲料的脱毒研究积累经验和数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒、菌种和引物

本试验所用生物材料及特征如表 1 所示，其中引物由上海生工生物科技有限公司合成。

表 1 本试验所用生物材料及特征

Table 1 Biological materials and characteristics used in this experiment

项目 Items	名称 Names	特征 Characters
质粒 Plasmid	Pm-ADTZ	本试验前期构建含 *ADTZ* 基因（2 088 bp）
	PGEM-Kmpgmt	本实验室构建，枯草芽孢杆菌整合表达载体[14]
	PTM$_1$M$_2$-ADTZ	本试验构建，含有 *ADTZ* 基因的枯草芽孢杆菌整合载体
菌种 Strain	*E.coli* DH5α	本实验室保存，大肠杆菌克隆宿主
	B.subtilis LN	本实验室筛选自秦岭羚牛粪便[15]
	B.subtilis ADTZ	本试验构建，表达 *ADTZ* 基因，并用作发酵菌种
引物 Primer	*ADTZ*	上游：5'-ATGGCCACCACAACTGTC-3'
	ADTZ	下游：5'-TCACAATCGTCTCTCAATG-3'

1.1.2 主要试剂

预染蛋白 Marker（MP203）、细菌基因组 DNA 提取试剂盒（DP302）、1 kb DNA Ladder（MD111），购于北京天根生化科技有限公司；非预染预染蛋白 marker（SM0431）、DNA marker（SM0331），购于赛默飞世尔科技（中国）有限公司；限制性内切酶 *Sac*Ⅱ、*BamH*Ⅰ，购于美国 Promega 公司；溶菌酶（L8120），购于北京所莱宝（Solarbio）生物科技有限公司；黄曲霉毒素 B$_1$(AFB$_1$)酶联免疫吸附测定（ELISA）检测试剂盒，购于北京华安麦科生物技术有限公司；*L*-色氨酸（*L*-Trp）、水解酪蛋白、琼脂糖等试剂，购于洛阳博冠商贸有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *ADTZ* 基因整合载体的构建

对质粒 PGEM-Kmpgmt 和质粒 Pm-ADTZ 分别用 *Sac*Ⅱ、*BamH*Ⅰ进行双酶切，凝胶电泳回收，用 T_4 DNA 连接酶 16 ℃连接 12 h。将连接产物转化到大肠杆菌（*E.coli* DH5α）感受态细胞中，挑取阳性克隆单菌落在液体溶菌肉汤（LB）培养基上扩大培养，提取质粒，对重组质粒进行 *Sac*Ⅱ、*BamH*Ⅰ酶切鉴定后，测序。并将重组质粒命名为 PTM_1M_2-ADTZ。

1.2.2 野生型枯草芽孢杆菌（*B.subtilis* LN）感受态的制备

野生型 *B.subtilis* LN 感受态的制备参照文献[16]进行制备。

1.2.3 重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的构建

取出野生型 *B.subtilis* LN 感受态细胞 500 μL，加入 10 μg 的 PTM_1M_2-ADTZ 质粒混匀，37 ℃、200 r/min 振荡培养 60 min，加入 500 μL 的 LB 液体培养基，37 ℃、200 r/min 培养 30 min 使菌体复苏。取 100 μL 菌液均匀涂布于含 LB 固体培养基上，37 ℃恒温培养箱中倒置培养 14~16 h。观察野生型 *B.subtilis* LN 菌落形态，用革兰氏染色进行初步检测。从平板上挑取重组菌单菌落，进行扩大培养，提取菌株全基因组，以材料中引物为模板，利用 PCR 技术进行检测，将含有 ADTZ 的枯草芽孢杆菌阳性菌记作 *B.subtilis* ADTZ。

1.2.4 重组菌 *B.subtilis* ADTZ 菌液的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测

将重组菌 *B.subtilis* ADTZ 菌液按 1:50 比例接种于 50 mL 的 LB 培养基中，37 ℃、220 r/min 培养约 18 h；以野生型 *B.subtilis* LN 为对照组。菌液低速离心 5 min，分别收集上清液和菌体。向菌体中加入 5 mL 的溶菌酶，用移液器重新制成混悬液，37 ℃培养 30 min 后取出，将溶液用超声波破碎仪破碎 10 min。分别取 *B.subtilis* ADTZ 菌液上清液、菌体破碎样品以及对照上清、菌体沉淀样品，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，观察试验结果。

1.2.5 重组菌对发霉玉米的脱毒试验

将 500 g 左右玉米加水至水分含量 20%，室温（25 ℃）放至能看到部分玉米胚有黑色霉变即为发霉玉米，将该玉米在 65 ℃条件下烘干、粉碎，充分混合均匀后测定其 AFB_1 含量为 63 μg/kg，均匀称取发霉玉米样品 9 份，每份 50 g，分别置于 500 mL 的锥形瓶中，加入 450 mL 的蒸馏水，121 ℃灭菌 20 min 后，将 9 个锥形瓶随机分为 3 组，分别为对照组、试验 1 组和试验 2 组，分别将 50 mL 灭菌 LB 液体培养基、野生型 *B.subtilis* LN 菌液（活菌计数法测定活菌数为 5.0×10^9 CFU/mL）、*B.subtilis* ADTZ 菌液（活菌计数法测定活菌数为 4.5×10^9 CFU/mL）接种于上述发霉玉米中，35 ℃恒温 200 r/min 发酵培养 48 h，每组 3 个重复。试验结束将试验样品用黄曲霉毒素 ELISA 检测试剂盒在酶标仪上检测 AFB_1 的含量，并

计算相应结果。

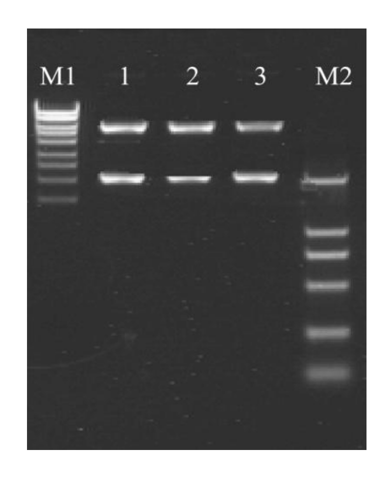
1.3　数据统计

试验数据通过 SPSS 11.5 进行单因素方差分析（one-way ANOVA），数据均采用“平均值±标准误”表示，P<0.05 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　整合载体 PTM_1M_2-ADTZ 的分析及鉴定

对提取到的整合载体 PTM_1M_2-ADTZ 进行检测，采用 *Sac* Ⅱ、*BamH* Ⅰ双酶鉴定，结果如图 1 所示。酶切后，其中 2 段大小均为 2 000 bp 左右，与 *ADTZ* 基因大小一致；另一段大小为 6 000 bp 左右，与质粒 PGEM-Kmpgmt 的载体部分大小一致。



M1 为 1 kb marker，由上到下分别为 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 kb；M2 为 DL2000 marker，由上到下分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp；泳道 1、2、3 分别为 PTM_1M_2-ADTZ 的双酶切鉴定。

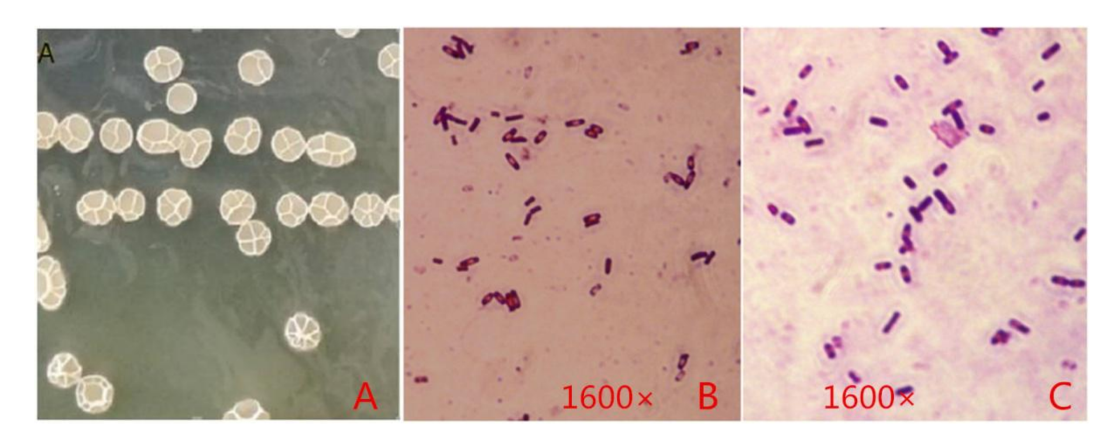
M1 is 1 kb marker, from up to bottom are 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 kb, respectively; M2 is DL2000 marker, from up to bottom are 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp, respectively; lanes 1, 2 and 3 are double enzyme digestion identification of PTM_1M_2-ADTZ, respectively.

图 1　整合载体 PTM_1M_2-ADTZ 的双酶切电泳图

Fig.1　Double digestion digestion electrophoresis pattern of integrated vector PTM_1M_2-ADTZ

2.2　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的菌落形态及革兰氏染色鉴定

对整合构建的重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的菌落进行观察，结果为菌落表面粗糙呈微乳白色，边缘不齐，中间突起后平铺，有不规则的褶皱，与枯草芽孢杆菌菌落形态一致，如图 2-A。通过革兰氏染色，显微镜下镜检结果为，在 1 600×油镜下观察，菌体呈蓝紫色，短杆状，有芽孢（图 2-C），和野生型 *B.subtilis* LN 显微镜下的形态相符（图 2-B）。



A 为 *B.subtilis* ADTZ 菌落形态；B 为 *B.subtilis* LN 染色图；C 为 *B.subtilis* ADTZ 染色图。

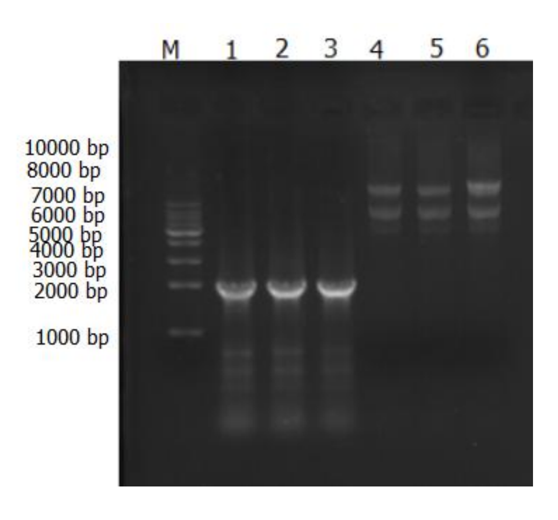
A is *B.subtilis* ADTZ colony morphology; B is Gram staining result of *B.subtilis* LN; C is Gram staining result of *B.subtilis* ADTZ.

图 2　重组菌的菌落形态和革兰氏染色结果

Fig.2　Colony morphology and Gram staining results of recombinant bacteria

2.3　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 整合结果的检测

提取重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的全基因组，以全基因组为模板，*ADTZ* 基因上下游引物扩增目的基因。将提取和扩增结果用琼脂糖凝胶电泳检测。检测结果如图 3 所示，其中泳道 4、5、6 为重组菌 *B.subtilis* ADTZ 全基因电泳结果，电泳发现明显的全基因组亮带，表明成功提取重组菌 *B.subtilis* ADTZ 全基因组；泳道 1、2、3 分别为重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的全基因 PCR 结果，扩增出来的片段大小为 2 000 bp 左右，与 *ADTZ* 基因片段大小（2 088 bp）相一致，初步验证 *ADTZ* 基因整合到重组菌 *B.subtilis* ADTZ 基因组中。将 PCR 扩增产物进行序列测定，测定的结果与 *ADTZ* 基因序列完全一致。说明 *ADTZ* 基因完全整合到野生型 *B.subtilis* LN 基因组中，成功构建了重组菌 *B.subtilis* ADTZ。



M 为 1 kb Marker（MD111）；泳道 1~3 为 *B.subtilis* ADTZ 的基因组目的基因 PCR 扩增结果

电泳图；泳道 4~6 为 *B.subtilis* ADTZ 全基因组电泳图。

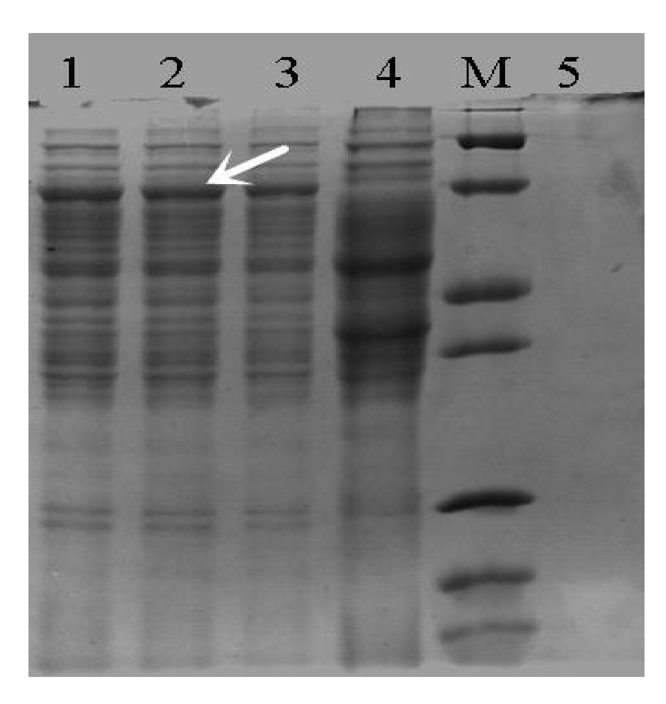
M is DNA Marker (MD111); lanes 1 to 3 are target gene PCR product electrophoresis of *B.subtilis* ADTZ; lanes 4 to 6 are electrophoresis of *B. subtilis* ADTZ whole genome.

图 3　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 的全基因组及目的基因电泳图

Fig.3　Electrophoresis result of whole genome and target gene of recombined *B.subtilis* ADTZ

2.4　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 基因表达结果

对重组菌 *B.subtilis* ADTZ 进行摇瓶培养，收集菌液和菌体，对菌体进行破碎后和野生型 *B.subtilis* LN 进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 4 所示。在重组菌 *B.subtilis* ADTZ 上清液中发现了约 70 ku 的蛋白条带，与 *ADTZ* 基因的表达产物大小一致。而在野生型 *B.subtilis* LN 的发酵液样品中没有这个大小的蛋白条带出现。在重组菌 *B.subtilis* ADTZ 菌体的破碎液样品中没有发现较明显的蛋白条带。符合枯草芽孢杆菌胞外分泌表达的特点。根据 SDS-PAGE 电泳检测结果，初步判定 *ADTZ* 基因在重组菌 *B.subtilis* ADTZ 中表达，表达产物分泌到发酵液中。



泳道 1~3 为 *B.subtilis* ADTZ 发酵上清液，泳道 4 为野生型 *B.subtilis* LN 发酵上清液，M 为 Protein Marker（由上到下分别为 116、66、45、35、25、18、14 ku），泳道 5 为 *B.subtilis* ADTZ 菌体破碎样品。

Lanes 1 to 3 are fermentation supernatant of *B.subtilis* ADTZ, lane 4 is fermentation supernatant of *B.subtilis* LN, M is Protein Marker (from top to bottom are 116, 66, 45, 35, 25, 18, and 14 ku, respectively), lane 5 is bacteria body protein of *B.subtilis* ADTZ

图 4　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 发酵液 SDS-PAGE 图

Fig.4　The SDS-PAGE picture of recombined *B.subtilis* ADTZ fermentation broth

2.5　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 对发霉玉米 AFB_1 的降解

按照试剂盒的要求将发酵试验的各样品进行处理，酶标仪检测结果通过 ELISA 分析软件分析并整理计算后，如表 2 所示。从表中可以看出，通过微生物发酵发霉玉米样品中的 AFB_1 含量均降低，用重组菌 *B.subtilis* ADTZ 菌种发酵的试验 1 组 AFB_1 含量显著低于其他 2 组（$P<0.05$），AFB_1 降解率显著高于试验 2 组（$P<0.05$）。用野生型 *B.subtilis* LN 菌种发酵也能降解一部分 AFB_1，但与重组菌 *B.subtilis* ADTZ 发酵相比 AFB_1 含量和 AFB_1 降解率均差异显著（$P<0.05$）。

表 2　重组菌 *B.subtilis* ADTZ 对发霉玉米 AFB_1 的降解

Table 2　Degradation of AFB_1 in moldy corn by recombined *B.subtilis* ADTZ

项目 Items	AFB_1 含量 Content of AFB_1/(μg/kg)	AFB_1 降解率 Degradation rate of AFB_1/%
对照组　（发霉玉米） Control group (moldy corn)	60.75 ± 0.43^{c}	
试验 1 组（*B.subtilis* ADTZ 发酵） Experimental group 1 (*B.subtilis* ADTZ fermentation)	19.20 ± 0.32^{a}	68.40 ± 0.38^{a}
试验 2 组（*B.subtilis* LN 发酵） Experimental group 2 (*B.subtilis* LN fermentation)	55.00 ± 0.65^{b}	9.47 ± 0.57^{b}

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

3　讨　论

3.1　*ADTZ* 基因在不同宿主中的表达

ADTZ 基因来源于真菌假密环菌(*Armillariellatabescens*)，已有报道 *ADTZ* 基因与载体 pMAL-c2x 重组，导入到大肠杆菌 BL21（DE3）细胞中实现了黄曲霉毒素在大肠杆菌中的异源融合表达，并检测出活性蛋白[10]。随后成功克隆并重组表达了一种具有 AFB_1 转化功能的黄曲霉毒素氧化酶（aflatoxin-oxidase，AFO）[17]，进一步验证了 *ADTZ* 基因的完整性，使

ADTZ 基因能够在真核细胞毕赤酵母菌中进行表达[11]。本试验通过构建整合表达载体使 *ADTZ* 基因在动物益生菌枯草芽孢杆菌中进行了表达，在对动物饲料的处理上更具可行性。

3.2　枯草芽孢杆菌表达系统的优势

本试验利用的表达宿主野生型 *B.subtilis* LN[15]，是从羚牛的新鲜粪便中分离筛选得到，进行了详细的鉴定，可作为动物益生菌添加剂使用。野生型 *B.subtilis* LN 作为一种益生菌，不产生细胞内毒素，可改善饲料品质，调节动物肠道的微生物平衡，改善饲料的适口性[18-19]。枯草芽孢杆菌可将外源基因表达的蛋白质，通过细胞的分泌通道直接分泌到细胞外，简化了大肠杆菌表达系统的破壁、纯化及回收过程，作用更直接。本试验通过 SDS-PAGE 检测，发现重组菌 *B.subtilis* ADTZ 菌液中有特异性蛋白条带，且与文献报道的 ADTZ 蛋白条带大小一致[20]，而在对照组野生型 *B.subtilis* LN 和菌体样品中未发现特异性蛋白条带，说明试验结果符合芽孢杆菌胞外分泌表达的特性。这种特性有利于重组蛋白正确折叠，有效减少包涵体形成，简化纯化工序[13, 21]，从而更有利于 ADTZ 蛋白的表达。与真核生物表达系统相比，枯草芽抱杆菌具有发酵条件简单、发酵周期短、无明显的密码子偏好性、生产成本低等优点[22]。

3.3　降解黄曲霉毒素的微生物及酶

国内外对降解黄曲霉毒素的微生物及酶做了很多研究。Doyle 等[23]发现，寄生曲霉在生长 14 h 后，菌丝能产生一种乳过氧化物酶降解 AFB_1，其产物为黄曲霉毒素 B_{2a}（AFB_{2a}）的衍生物和另一种水溶性衍生物，该产物的毒性远低于 AFB_1。Motomura 等[24]从平菇中分离获得蛋白大小约为 90 ku 的降解黄曲霉毒素的酶，通过荧光含量的测定，表明这种酶是从真菌假密环菌的胞内提取的一种氧化酶。雷元培等[25]对枯草芽孢杆菌进行降解黄曲霉毒素的生物活性、抗菌性及抗逆性的研究，结果表明，发酵后的上清液中存在解毒活性组分，对解毒活性物质进行加热和蛋白酶 K 变性处理后，解毒活性显著降低，表明起解毒作用的活性物质是其分泌的一种胞外酶。陆续的报道介绍枯草芽孢杆菌发酵液对 AFB_1 标准液的降解率达到 70%~80%[26-28]。本试验中采用发霉玉米作为脱毒对象，其毒素含量和存在方式较标准液有很大区别。重组菌 *B.subtilis* ADTZ 与野生型 *B.subtilis* LN 对黄曲霉毒素均有降解作用，但差异显著。这说明枯草芽孢杆菌具备降解黄曲霉毒素的能力，但是会随着菌株特性不同有较大差异。通过基因工程的重组表达会极大提高野生菌种的降解黄曲霉毒素的能力。

4　结　论

ADTZ 基因可成功整合到野生型 *B.subtilis* LN 中，并进行了胞外分泌表达，表达产物具有生物活性，能有效地降解 AFB_1。

参考文献：

[1] REDDY K,SALLEH B,SAAD B,et al.An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health[J].Toxin Reviews,2010,29(1):3–26.

[2] KURTZMAN C P,HORN B W,HESSELTINE C W.*Aspergillus nomius*,a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*[J].Antonie van Leeuwenhoek,1987,53(3):147–158.

[3] ITO Y,PETERSON S W,WICKLOW D T,et al.*Aspergillus pseudotamarii*,a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*[J].Mycological Research,2001,105(2):233–239.

[4] ZHI Q Q,XIE Y Y,HE Z M.Genome mining for aflatoxin biosynthesis[J].Fungal Genomics and Biology,2013,3(1):108–110.

[5] YIANNIKOURIS A,JOUANY J P.Mycotoxins in feeds and their fate in animals:a review[J].Animal Research,2002,51(2):81–99.

[6] YU J J.Current Understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination[J].Toxins,2012,4(11):1024–1057.

[7] 计成,赵丽红.黄曲霉毒素生物降解的研究及前景展望[J].动物营养学报,2010,22(2):241–245.

[8] LIU D L,YAO D S,LIANG R,et al.Detoxification of aflatoxin B_1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*[J].Food and Chemical Toxicology,1998,36(7):563–574.

[9] 胡丽莎,谢春芳,刘大岭.黄曲霉毒素氧化酶的酶动力学研究[J].暨南大学学报（自然科学与医学版）,2012,33(5):496–500.

[10] 胡熔,刘大岭,谢春芳,等.黄曲霉毒素解毒酶在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及其圆二色谱分析[J].中国生物工程杂志,2011,31(4):71–76.

[11] 左振宇,刘大岭,胡亚冬,等.密码子优化的重组黄曲霉毒素解毒酶(rADTZ)在毕氏酵母中组成型分泌表达的研究[J].中国农业科技导报,2007,9(5):87–94.

[12].计成,贾如,赵丽红.基因工程技术在黄曲霉毒素生物降解中的应用[J].中国农业科学,2017,50(17):3422–3428.

[13].余小霞,田健,刘晓青,等.枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子研究进展[J].生物技术通报,2015,31(2):35–44.

[14].聂利波,王占彬,史敦胜,等.枯草芽孢杆菌纤维素酶基因整合载体的构建[J].食品科

学,2017,38(10):31–36.

[15] LI W,HUAN X J,ZHOU Y,et al.Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*)[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2009,383(4):397–400.

[16] 李春艳,冯凤兆,冯露,等.野生型枯草芽孢杆菌N4的spizizen转化法优化[J].东北农业大学学报,2015(2):78–82,108.

[17] 温思霞,管敏,周涛,等.假蜜环菌黄曲霉毒素氧化酶的基因克隆、表达、纯化及酶学性质分析(英文)[J].微生物学报,2011,51(9):1212–1221.

[18] 冯江鑫,孙焕林,王朝阳,等.枯草芽孢杆菌发酵棉籽粕对黄羽肉鸡营养物质代谢率、生产性能的影响[J].粮食与饲料工业,2015(7):43–46.

[19] 陈国营,詹凯,朱由彩,等.枯草芽孢杆菌及其发酵豆粕对蛋鸡肠道菌群和粪便中N、S含量的影响[J].中国家禽,2012,34(6):10–15.

[20] 姚冬生,黄辉,赵龙,等.假密环菌cDNA文库的构建及其阿拉伯糖苷酶基因的克隆(英文)[J].中国生物工程杂志,2005,25(6):65–70.

[21] 王靖瑶,王天女,卢磊,等.大肠杆菌Ⅰ型分泌表达系统研究进展及提高蛋白表达量的策略[J].中国生物工程杂志,2014,34(6):98–104.

[22] 孙宏,姚晓红,吴逸飞,等.产纤维素酶枯草芽孢杆菌的培养条件优化及发酵模型构建[J].中国食品学报,2012,12(5):76–81.

[23] DOYLE M P,MARTH E H.Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase[J].Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,1978,166(5):271–273.

[24] MOTOMURA M,TOYOMASU T,MIZUNO K,et al.Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from Pleurotus ostreatus[J].Microbiological Research,2003,158(3):237–242.

[25] 雷元培,赵丽红,马秋刚,等.降解黄曲霉毒素枯草芽孢杆菌的解毒性、抗菌性及抗逆性研究[J].饲料工业,2011,32(24):23–27.

[26] 马芳芬.枯草芽孢杆菌BS-02降解玉米黄曲霉毒素的研究[D].硕士学位论文.郑州:河南工业大学,2016.

[27] 孙玲玉,李超,郝海玉,等.泰山枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对黄曲霉毒素B_1的降解研究[J].中国畜牧兽医,2014,41(8):246–250.

[28] FARZANEH M,SHI Z Q,GHASSEMPOUR A,et al.Aflatoxin B1 degradation by

Bacillus subtilis UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran[J].Food Control,2012,23(1):100–106.

Expression and Application of Aflatoxin Detoxification Enzyme Gene in *Bacillus subtilis*

SHI Dunsheng　NIE Libo　SONG Yangyang　LI Yuanxiao　LI Wang*

(*College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang* 471023*, China*)

Abstract: This experiment was conducted to study the expression and application of aflatoxin detoxification enzyme (*ADTZ*) gene in *Bacillus subtilis* （*B.subtilis*）. The *ADTZ* gene was transformed into wild-type *B.subtilis* LN genome by constructing an integrated vector of *B.subtilis*. The expression of ADTZ protein was detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis （SDS-PAGE）. And the recombinant *B.subtilis* were inoculated in moldy corn as fermentation strains for the fermentation experiment, and the content of aflatoxin B_1 (AFB_1) in moldy corn samples was detected to validate the expression effect of *ADTZ* gene in *B.subtilis.* The results showed that the *ADTZ* gene was successively integrated into wild type *B.subtilis* genome by constructing integrative expression vector. The recombined *B.subtilis* could secrete the specific protein and it was detected by SDS-PAGE. The content of AFB_1 in the fermented moldy corn of recombined *B.subtilis* had significant difference with the fermented moldy corn of uninoculated and wild type *B.subtilis* LN（$P<0.05$）. It showed that the *ADTZ* gene is successfully integrated into wild type *B.subtilis* LN and expressed in extracellular. The expressed product has biological activity, and can degrade AFB_1 effectively.

Key words: aflatoxin decomposition enzyme; gene recombination; *Bacillus subtilis*; fermentation

*Corresponding author, associate professor, E-mail: liwang@haust.edu.cn　(责任编辑　武海龙)